

DOCKET NO: 0010-1075-0 PCT

09/462472

420 Rec'd PCT/PTO 14 JAN 2000

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Hiroshi MATSUI, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP98/03239

INTERNATIONAL FILING DATE: 17 July 1998

FOR: METHOD FOR PRODUCING PURINE NUCLEOSIDE BY FERMENTATION

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
JAPAN	9/194603	18 JULY 1997

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. **PCT/JP98/03239**.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
William E. Beaumont
Registration No. 30,996

Crystal Square Five
Fourth Floor
1755 Jefferson Davis Highway
Arlington, Virginia 22202
(703) 413-3000

SEARCHED

INDEXED
SERIALIZED
FILED

THIS PAGE BLANK (USPTO)

09P6TA62472
03239

17.07.98

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 31 JUL 1998
WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1997年 7月18日

出願番号
Application Number:

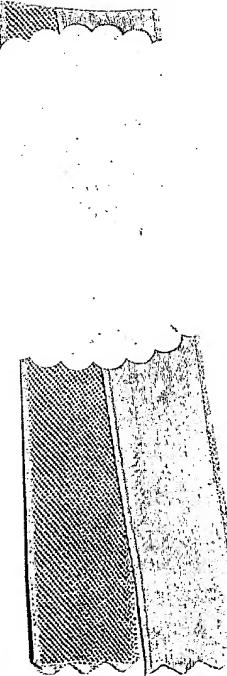
平成 9年特許願第194603号

出願人
Applicant(s):

味の素株式会社

**PRIORITY
DOCUMENT**

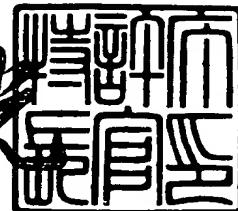
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



1998年 5月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平10-3035570

【書類名】 特許願
【整理番号】 97-086
【提出日】 平成 9年 7月18日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
C12P 19/32
【発明の名称】 発酵法によるプリンヌクレオシドの製造法
【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社
中央研究所内

【氏名】 松井 裕

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社
中央研究所内

【氏名】 川崎 寿

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社
中央研究所内

【氏名】 島岡 恵

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社
中央研究所内

【氏名】 倉橋 修

【特許出願人】

【識別番号】 000000066
【氏名又は名称】 味の素株式会社
【代表者】 江頭 邦雄
【電話番号】 03-5250-8178

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011202

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 発酵法によるプリンヌクレオシドの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 エシェリヒア属に属し、プリンヌクレオシド生産能を有する微生物。

【請求項2】 プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の活性が上昇することによってプリンヌクレオシド生産能を獲得した請求項1記載の微生物。

【請求項3】 プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の遺伝子の発現量が上昇することによってプリンヌクレオシド生産能を獲得した請求項1記載の微生物。

【請求項4】 プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の調節が解除されることによってプリンヌクレオシド生産能を獲得した請求項1記載の微生物。

【請求項5】 プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素が、ホスホリボシリピロリン酸アミドトランスフェラーゼである請求項3または4記載の微生物。

【請求項6】 プリン・リプレッサーが不活化することによりプリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の調節が解除される請求項4記載の微生物。

【請求項7】 プリンヌクレオシド生合成から分岐して他の代謝産物にいたる反応を遮断することによってプリンヌクレオシド生産能を獲得した請求項1記載の微生物。

【請求項8】 プリンヌクレオシド生合成から分岐して他の代謝産物にいたる反応が、サクシニルーアデノシンモノリン酸シンターゼ、プリンヌクレオシド・フォスフォリラーゼ、アデノシン・デアミナーゼ、イノシンーグアノシン・キナーゼから選ばれる酵素に触媒される反応である請求項7記載の微生物。

【請求項9】 請求項1から8記載の微生物を培地に培養し、プリンヌクレオシドを生成蓄積せしめ、これを回収することを特徴とする発酵法によるプリンヌクレオシドの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は5' -イノシン酸および5' -グアニル酸の合成原料として重要な物

質であるイノシンおよびグアノシン等のプリンヌクレオシドの製造法、およびその製造に用いられる新規微生物に関する。

【0002】

【従来の技術】

発酵法によるイノシンおよびグアノシンの生産に関しては、アデニン要求株、またはそれにプリンアナログをはじめとする各種の薬剤耐性を付与したバチルス属（特公昭38-23039、特公昭54-17033、特公昭55-2956、特公昭55-45199、特開昭56-162998、特公昭57-14160、特公昭57-41915、特開昭59-42895）、およびプレビバクテリウム属（特公昭51-5075、特公昭58-17592、Agric.Biol.Chem., 42,399(1978)）等を用いる方法が知られている。

【0003】

このような変異株を取得するには、従来、紫外線照射やニトロソグアニジン（N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine）などの変異誘起処理を行い、適当な選択培地を用いて、目的とする変異株を取得するという方法が行われてきた。一方で、遺伝子工学技術を用いた生産株の育種もバチルス属（特開昭58-158197、特開昭58-175493、特開昭59-28470、特開昭60-156388、特開平1-27477、特開平1-174385、特開平3-58787、特開平3-164185、特開平5-84067、特開平5-192164）、およびプレビバクテリウム属（特開昭63-248394）で行われている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

発酵法によってプリンヌクレオシドを製造するために好適な微生物を創製することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは上記課題を解決するために、発酵法によりプリンヌクレオシドを

製造するために従来用いられてきた微生物とは属を異にするエシェリヒア属細菌にプリンヌクレオシド生産能を付与することを着想し、これを実現することに成功し、本発明を完成した。

【0007】

すなわち本発明は、エシェリヒア属に属し、プリンヌクレオシド生産能を有する微生物である。

【0008】

詳しくは、プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の活性が上昇することによってプリンヌクレオシド生産能を獲得した当該微生物、プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の遺伝子の発現量が上昇することによってプリンヌクレオシド生産能を獲得した当該の微生物、および、プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の調節が解除されることによってプリンヌクレオシド生産能を獲得した当該微生物である。

【0009】

上記プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素とは、たとえばホスホリボシルピロリン酸（PRPP）アミドトランスフェラーゼである。

【0010】

上記プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の調節が解除される手段としては、たとえばプリン・リプレッサーの欠失がある。

【0011】

さらに本発明は、プリンヌクレオシド生合成から分岐して他の代謝産物にいたる反応を遮断することによってプリンヌクレオシド生産能を獲得した当該微生物である。

【0012】

上記プリンヌクレオシド生合成から分岐して他の代謝産物にいたる反応は、たとえばサクシニルーアデニンモノリン酸（AMP）シンターゼ、プリンヌクレオシド・フォスフォリラーゼ、アデノシン・デアミナーゼ、イノシンーグアノシン・キナーゼから選ばれる酵素に触媒される反応がある。

【0013】

また本発明は、上記微生物を培地に培養し、プリンヌクレオシドを生成蓄積せしめ、これを回収することを特徴とする発酵法によるプリンヌクレオシドの製造法である。

【0014】

【発明の実施の形態】

(1) エシェリヒア属に属し、プリンヌクレオシド生産能を有する微生物

本発明にいうエシェリヒア属に属する微生物の例としては、エシェリヒア・コリ(*E.coli*)等があげられる。*E.coli*を遺伝子工学的手法を用いて育種する場合には、*E.coli* K12株を用いることができる。

【0015】

本発明にいうプリンヌクレオシドとは、たとえばイノシン、グアノシン、アデノシン等を含む。

【0016】

エシェリヒア属に属し、プリンヌクレオシド生産能を有する微生物を育種するには、プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の活性を上昇させることによる育種、一例として、プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の遺伝子の発現量を上昇させることによる育種を採用できる。あるいは、プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の調節を解除することによる育種も採用できる。

【0017】

(2) プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の活性が上昇した微生物

プリンヌクレオシド生合成に関与する全酵素と、同酵素が触媒する全反応はすでに明らかにされている(*Escherichia coli and Salmonella CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY second Edition vol. 1 and vol. 2 ASM PRESS WASHINGTON D.C.*)。これら酵素のうち、律速段階となっている反応を触媒する酵素の酵素活性を上昇させることによって、プリンヌクレオシド生産能を付与することができる。そのような律速段階となっている反応を触媒する酵素は、たとえばPRPPアミドトランスフェラーゼである。

【0018】

プリンヌクレオシド生合成に関する酵素の酵素活性を上昇させるには、酵素の遺伝子の発現量を上昇させねばよい。遺伝子の発現量を上昇させるには、遺伝子の調節領域を改良すればよい。調節領域の改良とは、たとえばプロモーターに変異を導入することによってプロモーター強化をおこない下流にある遺伝子の転写量を増加させることをいう。プロモーターに変異を導入する以外にも、lac, trp, tac, trc, PLその他の微生物内で機能するプロモーターを新たに導入してもよい。またはエンハンサーを新たに導入することによって遺伝子の転写量を増加させることをいう。

【0019】

また、遺伝子の発現量を上昇させるには、遺伝子のコピー数を上昇させればよい。具体的には、遺伝子を多コピー型のベクターに接続して組換えDNAを作製し、同組換えDNAを微生物に保持させる。ここでベクターとは、プラスミドやファージ等広く用いられているものを含むが、これら以外にも、トランソポゾン(Berg,D.E. and Berg,C.M., Bio/Technol., 1, 417(1983))やMuファージ(特開平2-109985)も含む。遺伝子を相同組換え用プラスミド等を用いた方法で染色体に組込んでコピー数を上昇させることも可能である。

【0020】

エシェリヒア属に属し、プリンヌクレオシド生合成に関する酵素の遺伝子の発現量を上昇した微生物の誘導に当たっては、主としてE.coliの既知の遺伝子情報に基づき、PCR(polymerase chain reaction)法を用いて必要な遺伝子領域を增幅取得し育種に用いることができる。

【0021】

たとえばE.coli K12のW3110株(ATCC27325)の染色体DNAよりPCR法を用いてPRPPアミドトランスフェランフェラーゼ(PRPP amidotransferase)をコードする遺伝子であるpurFをクローニングする。この際使用する染色体DNAはE.coli由来であればどの菌株でもよい。purFはアデノシンモノリン酸(AMP)やグアノシンモノリン酸(GMP)でフィードバック阻害を受けるPRPP amidotransferaseをコードする遺伝子を言い、遺伝的多系性などによる変異型も含む。なお、遺伝的多系性

とは、遺伝子上の自然突然変異によりタンパク質のアミノ酸配列が一部変化している現象をいう。

【0022】

プリンヌクレオシド生合成に関する酵素の酵素活性を上昇させるには、酵素の構造遺伝子自体に変異を導入して、酵素そのものも活性を上昇させても良い。

【0023】

(3) プリンヌクレオシド生合成に関する酵素の調節が解除された微生物

プリンヌクレオシド生合成に関する酵素の調節とは、同酵素の活性を負に制御する仕組みをいい、たとえば生合成経路中間体または最終産物によるフィードバック阻害、アテニュエーション、転写抑制などをさす。微生物が製造したプリンヌクレオシドは、同調節を通じてプリンヌクレオシド生合成に関する酵素の活性を阻害し、または、同酵素をコードする遺伝子の発現を抑制する。したがって、微生物にプリンヌクレオシドを生産させるためには同調節を解除することが望ましい。

【0024】

上記調節を受けるプリンヌクレオシド生合成に関する酵素は、AMPやGMPでフィードバック阻害を受けるPRPP amidotransferaseがあげられる。そのほか、GMPによるフィードバック阻害をイノシンモノリン酸デヒドロゲナーゼ (IMP dehydrogenase: guaB) とGMPシンターゼ(GMP synthase: guaA)が受けている。また、プリン・オペロン、guaBAは抑制を受けている。

【0025】

調節を解除する方法は、酵素をコードする遺伝子またはその調節領域に変異を導入する方法がある。同変異とは、フィードバック阻害を解除する変異であり、構造遺伝子内の変異であることが多い。あるいは、同変異とは、アテニュエーションを解除する変異であり、アテニュエーター内の変異であることが多い。または、同変異とは抑制を解除する変異であり、リプレッサーと呼ばれる調節蛋白質をコードする遺伝子の変異、あるいはオペレーター領域内の変異が多い。

【0026】

抑制を解除する方法としては、プリン・リプレッサーを不活化させる方法がある。同リプレッサーは、プリンヌクレオチドが多量に存在する条件下でプリンオペロンのオペレーター領域に結合し、結果として同オペロンの転写が抑制される。同リプレッサーの不活化は、抑制の解除につながる。

【0027】

遺伝子に変異を生じさせるには、部位特異的変異法 (Kramer,W. and Frits,H. J., *Methods in Enzymology*, 154, 350(1987))、リコンビナントPCR法 (PCR Technology, Stockton Press(1989))、特定の部分のDNAを化学合成する方法あるいは当該遺伝子をヒドロキシアミン処理する方法や当該遺伝子を保有する菌株を紫外線照射処理、もしくはニトロソグアニジンや亜硝酸などの化学薬剤処理をする方法がある。また遺伝子の機能を完全に不活化する目的の場合には適当な制限酵素サイトにDNAの付加や欠失を入れたりすることがある。

【0028】

プリンヌクレオシド生合成に関する酵素の調節が解除されたものを選択する場合、酵素の発現量を酵素活性を測定することによって調べるか、抗体を用いて調べる。また、酵素の調節が解除された変異株を取得する一つの方法として、8-アザアデニンや8-アザグアニンなどのプリンアナログを含む最小培地で生育する菌株を選択し、酵素の発現量や活性の変化を確認する方法がある。

【0029】

(4) プリンヌクレオシド生合成から分岐して他の代謝産物にいたる反応を遮断することによってプリンヌクレオシド生産能を獲得した微生物

エシェリヒア属に属する微生物のプリンヌクレオシド生合成経路は明らかになっており、プリンヌクレオシド生合成に関する全酵素と、同酵素が触媒する全反応はすでに明らかにされている (Escherichia coli and Salmonella CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY second Edition vol. 1 and vol. 2 ASM PRESS WASHINGTON D.C.)。これらに加え、他の代謝産物にいたる反応のいくつかは明らかになっている。

【0030】

他の代謝産物にいたる反応が遮断された微生物は、同代謝産物を要求するようになる可能性がある。同代謝産物を要求するようになった微生物を培養するためには、培地に栄養物質として同代謝産物あるいはその中間体を添加する必要がある。したがって、遮断されるべき反応は、プリンヌクレオシド生合成経路から分岐するもののいかなるものでもよいわけではない。遮断されるべき反応を決定する際には、培地に新たな同代謝産物を添加する必要が生じない反応を選択することが望ましい。

【0031】

また、他の代謝産物にいたる反応のうち、いかなるものを遮断してもつねにプリンヌクレオシドの生産能が向上するとはかぎらない。微生物がプリンヌクレオシドを生産する時期に、プリンヌクレオシド中間体あるいはプリンヌクレオシドを他の代謝産物に変換する方向の反応が進行している場合に、同反応を遮断することがプリンヌクレオシド生産性向上につながる可能性がある。

【0032】

プリンヌクレオシド生合成経路から分岐して他の代謝産物にいたる反応のうち、それを遮断することによって実際にプリンヌクレオシド生産性向上につながるもののは、プリンヌクレオシド生合成経路図がすでに明らかになっているので、これに基づき予測される。

【0033】

プリンヌクレオシド生合成から分岐して他の代謝産物にいたる反応を遮断する方法としては、その反応を触媒する酵素を欠失させるか、あるいは、その反応を触媒する酵素を不活化させる方法などがあげられる。酵素を欠失させるには、その酵素をコードする遺伝子を欠失させる方法があげられる。酵素を不活化させるには、その酵素をコードする遺伝子に変異を導入するか、あるいはその酵素を特異的に不活化する薬剤を添加する方法などがある。

【0034】

プリンヌクレオシド生合成から分岐して他の代謝産物にいたる反応のうち、それを遮断することによって実際にプリンヌクレオシド生産性向上につながるもの

としては、サクシニル-AMPシンターゼ、プリンヌクレオシド・フォスフォリーゼ、アデノシン・デアミナーゼ、イノシンーグアノシン・キナーゼから選ばれる酵素に触媒される反応があげられる。

【0035】

例えば、IMPからサクシニルAMPへの分岐を遮断し、イノシンからヒポキサンチンへの転換を遮断すると、同遮断の結果IMPはAMPへ転換されることがなくなり、イノシンからヒポキサンチンへ転換されることがなくなる。そして、イノシンが蓄積されることが予想される。これらの有効性を確認するためには目的に応じて取得した変異株を培養してイノシンの生産性を見る。

【0036】

後述の実施例では、*E. coli*においてサクシニル-AMPシンターゼ遺伝子（purA 遺伝子）を破壊してアデニン要求性を付与したとき、*E. coli*のアデニン要求株を生育させるのにアデニンないしはアデノシン等のAMP系物質の培地への添加が必要となった。しかし、これらの添加物質は、*E. coli*においてはただちにイノシンに転換し、AMP系物質の消化により、一定のところで生育が停止してしまう性質が見いだされた。そこでその生育を維持させる手段として、*E. coli*の代謝経路から判断してアデノシンからイノシンへの転換に関与するアデノシン・デアミナーゼを不活化する必要性が予測された。このようにして、アデノシン・デアミナーゼの不活化による効果は確認され、イノシンの蓄積が観察された。

【0037】

(5) プリンヌクレオシドの製造法

プリンヌクレオシド生産能を獲得した微生物を用いて発酵法によってプリンヌクレオシドを製造する方法を以下説明する。

【0038】

使用するプリンヌクレオシド生産用培地は、炭素源、窒素源、無機イオンおよび必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地である。炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトース、アラビノース、マルトース、キシロース、トレハロース、リボースや澱粉の加水分解物などの糖類、グリセロール、マンニトールやソルビトールなどのアルコール類、グルコン酸、フ

マール酸、クエン酸やコハク酸等の有機酸類を用いることができる。窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。有機微量栄養素としては、ビタミンB1等のビタミン類、アデニンやRNA等の核酸類などの要求物質または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カルシウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。

【0039】

培養は好気的条件下で16～72時間程度実施するのがよく、培養温度は30℃～45℃に、培養中pHは5～8に制御する。なお、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、さらにアンモニアガス等を使用することができる。

【0040】

発酵液からのプリンヌクレオシドの採取は通常、イオン交換樹脂法、沈殿法その他の公知の方法を組合せることにより実施できる。

【0041】

(6) プリンヌクレオシド生産菌の具体例

まずエシェリヒア・コリ(*E.coli*) K12のW3110株 (ATCC27325)の染色体DNAよりPCR法を用いてPRPPアミドトランスフェランフェラーゼ(PRPP amidotransferase)をコードする遺伝子であるpurF、プリン・リプレッサー (purine repressor)をコードする遺伝子であるpurR、プリンヌクレオシド・フォスフォリラーゼ (purine nucleoside phosphorylase)をコードする遺伝子であるdeoD、サクシニル-AMPシンターゼ (succinyl-AMP synthase)をコードする遺伝子であるpurA、アデノシン・デアミナーゼ (adenosine deaminase)をコードする遺伝子であるadDおよびイノシングアノシン・キナーゼ(inosine-guanosine kinase)をコードする遺伝子であるgskをクローニングし、これらの遺伝子をそれぞれの目的に応じて変異させた。この際使用する染色体DNAは*E.coli*由来であればどの菌株でもよい。

【0042】

purFに導入する変異とは、purFを破壊するための変異と、PRPP amidotransferaseのフィードバック阻害を解除するための変異である。purRに導入する変異とは、purRを破壊するための変異である。deoDに導入する変異とは、deoDを破壊するための変異である。purAに導入する変異とは、purAを破壊するための変異である。addに導入する変異とは、addを破壊するための変異である。gskに導入する変異とは、gskを破壊するための変異である。

【0043】

遺伝子に変異を生じさせるには、部位特異的変異法 (Kramer,W. and Frits,H.J., Methods in Enzymology, 154, 350(1987))、リコンビナントPCR法 (PCR Technology, Stockton Press(1989))、特定の部分のDNAを化学合成する方法あるいは当該遺伝子をヒドロキシアミン処理する方法や当該遺伝子を保有する菌株を紫外線照射処理、もしくはニトロソグアニジンや亜硝酸などの化学薬剤処理をする方法がある。また遺伝子の機能を完全に不活化する目的の場合には適当な制限酵素サイトにDNAの付加や欠失を入れたりすることがある。

【0044】

次に、PRPP amidotransferaseのフィードバック阻害を解除するための変異が導入されたpurFを組換えDNAとして適当な微生物に導入し、発現させることにより、フィードバック阻害が実質的に解除されたPRPP amidotransferase遺伝子(purF)を保有する微生物を取得する。以上の方法で取得される組換えDNAとは、フィードバック阻害を解除したPRPP amidotransferase遺伝子(purF)等の有用遺伝子をパッセンジャーとして、プラスミドやファージDNAのベクターに組込んだものをいう。その際、該有用遺伝子の発現を効率的に実施するために、lac, trp, tac, trc, PLその他の微生物内で機能するプロモーターを用いてもよい。

【0045】

なお、ここでいう組換えDNAには、該有用遺伝子をトランソポゾン(Berg,D.E. and Berg,C.M., Bio/Technol., 1, 417(1983))、Muファージ(特開平2-109985)または相同組換え用プラスミド等を用いた方法で染色体に組んだものも含まれる。

【0046】

相同組換え用プラスミドとしては、温度感受性複製起点を有するプラスミドが使用される。温度感受性複製起点を有するプラスミドは、許容温度 (permissive temperature) 、例えば30°C付近では複製できるが、非許容温度 (non-permissive temperature) 、例えば37°C～42°Cでは複製できない。温度感受性複製起点を有するプラスミドを用いた相同組換え法では、必要に応じて、許容温度でプラスミドを複製させたり、非許容温度でプラスミドを宿主から脱落させたりすることができます。後述の実施例では、相同組換え用プラスミドとして、pMAN997を使用したが、pMAN997はpMAN031 (J.Bacteriol., 162, 1196(1985))とpUC19 (宝酒造社製) のそれぞれVsp I -HindIII断片を繋ぎ換えたものである (図1)。

【0047】

また相同組換え法 (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972)) を用いて染色体上の特定の遺伝子機能を不活化し、プリンヌクレオシドの生産能を向上させた。不活化される遺伝子とは、その不活化によってプリンヌクレオシド生合成に関する酵素の遺伝子の発現量が上昇するものである。具体的には、染色体上のpurine repressor遺伝子 (purR) を破壊してPRPP amidotransferase遺伝子 (purF) を始めとするプリンヌクレオチド生合成遺伝子の発現抑制機構の解除を行った。

【0048】

さらに、プリンヌクレオシド生合成から分岐して他の代謝産物にいたる反応を触媒する酵素をコードする遺伝子を破壊した。具体的には、purine nucleoside phosphorylase遺伝子 (deoD) を破壊して、イノシンおよびグアノシンのヒポキサンチンおよびグアニンへの分解を抑制した。また、succinyl-AMP synthase遺伝子 (purA) を破壊して、アデニン要求性を付与した。さらに、adenosine deaminase遺伝子 (add) を破壊してアデノシンからイノシンへの転換を抑制した。最後に、inosine-guanosine kinase遺伝子 (gsk) を破壊してイノシンおよびグアノシンからIMPおよびGMPへの転換を抑制した。もちろん、当該遺伝子を保有する菌株を紫外線照射処理、もしくはニトロソグアニジンや亜硝酸などの化学薬剤処理して、目的の遺伝子の機能を不活化することも行われる。

【0049】

組換えDNAを有する微生物としては、該PRPP amidotransferase等の目的の酵素をコードする遺伝子が発現するエシェリヒア属に属する微生物を用いた。

【0050】

また該PRPP amidotransferase遺伝子(purF)の効率的活用のために他の有用遺伝子、例えばPRPPからIMP生合成に関わるpurF以外の遺伝子(purD,purT,purL,purM,purK,purE,purC,purB,purH)、IMP dehydrogenase遺伝子(guaB)、GMP synthase遺伝子(guaA)やPRPP synthase遺伝子(prs)等と組合せて利用するとよい。その際、これらの有用遺伝子は該PRPP amidotransferase遺伝子(purF)と同じく、宿主の染色体上に存在しても、プラスミドやファージ上に存在してもよい。

【0051】

以上 の方法で取得されるpurA (succinyl-AMP synthase遺伝子) 欠失、および／あるいはdeoD (purine nucleoside phosphorylase遺伝子) 欠失、および／あるいはpurR (purine operon repressor遺伝子) 欠失、および／あるいは脱感作型purF (PRPP amidotransferase遺伝子) 、および／あるいはadd (adenosine deaminase遺伝子) 欠失、および／あるいはgsk (inosine-guanosine kinase遺伝子) 欠失を有する微生物、あるいは脱感作型PRPP amidotransferase遺伝子(purF)を含む組換えDNAで形質転換された本微生物を培養し、培養液に目的のイノシンおよびグアノシン等のプリンヌクレオシドを生成蓄積せしめ、これを採取する。

【0052】

【実施例】

【0053】

【実施例1】

1) PRPP amidotransferase遺伝子(purF)欠失株の取得

purFの取得は遺伝子データバンク (GenBank Accession No.M26893) の情報に基づき、CTCCTGCAGAACGAGGAAAAAGACGTATG (配列番号1) とCTCAAGCTTCATCCTTCG TTATGCATTCG (配列番号2) の29merと31merの両端プライマーによるPCR法 (94°C, 30sec, 55°C, 1min, 72°C, 2min, 30サイクル, Gene Amp PCR System Model 9600(ノーリマ社製)) で行い、SD-ATGと翻訳終止コドンをカバーする構造遺伝子領域の約15

30bpをpCRTMIIベクター(Invitrogen社製)にクローン化した。本ベクターはPCR産物増幅断片をそのままクローニングすることができ、また、クローニングサイトの両近傍に制限酵素サイトとしてEcoRIサイトが存在する。またPCR用プライマーにはPstIサイトとHindIIIサイトがそれぞれデザインされている。

【0054】

クローン化された1530bpのpurF断片の5'側から約880bpの位置にBgIIIサイトが1ヶ所あるが、pCRTMIIベクターそのものにもBgIIIサイトが1ヶ所あるので、プラスミドをBgIIIで部分消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化した後に、T4 DNAリガーゼで連結した。このライゲイション液でE.coli HB101のcompetent cellを形質転換し、アンピシリン25μg/mlを含むLB(Tryptone 1%, Yeast extract 0.5%, NaCl 0.1%, Glucose 0.1%, pH7)寒天プレートに生育する形質転換体を得た。18クローンの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、この中からEcoRIで約1550bpの断片が得られ、かつBgIIIで本断片が切断されないプラスミドDNA(pCRTMIIpurF' #14)を選択した。本プラスミドDNAが有するpurFはBgIIIサイトでフレームシフトが生じることになり、コードされる酵素は機能を持たなくなると予測される(図2)。

【0055】

次に、pCRTMIIpurF' #14をEcoRI消化し、purFを含む約1.6Kbの断片を調製した。この断片を温度感受性複製起点(tsori)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997(図1)のEcoRIサイトに挿入し、目的の形質転換体を得た。この形質転換体より調製したプラスミドpMAN997purF' #14でE.coli W3110(野生株)を30℃で形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン25μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、30℃で一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニー化するようにアンピシリン25μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42℃で生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42℃で生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30℃で一晩培養した後に、LB液体培地3ml/試験管に接種し、42℃で3~4時間、振とう培養した。

これをシングルコロニーが得られるように適当に希釀($10^{-5} \sim 10^{-6}$ 程度)し、LB寒天プレートに塗布し、42℃で一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から適当に100コロニーをピックアップしてそれぞれをLB寒天プレートとアンピシリン $25\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。さらにアンピシリン感受性のクローンの中から最小培地(1L当たり Na_2HPO_4 6.8g, KH_2PO_4 3g, NaCl 0.5g, NH_4Cl 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15mg, ThiaminHCl 2mg, Glucose 0.2g)に生育せず、最小培地+ヒポキサンチン 50mg/L添加培地には生育するクローンを選択した。さらにはこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRによりpurF約1.5kb断片を増幅させ、 BgIII で切断されないことを確認した。以上を満足するクローンをpurF欠失株とし、ここではF-2-51株およびF-1-72株とした。

【0056】

2) Succinyl-AMP synthase遺伝子(purA)欠失株の取得

purAの取得は遺伝子データバンク (GenBank Accession No.J04199) の情報に基づき、CTCGAGCTCATGGGTAACAACGTCGTCGTAC (配列番号3) とCTCGTCGACTTACGGT CGAACGGGTCGCGC (配列番号4) の31merと31merの両端プライマーによるPCR法 (94℃, 30sec, 55℃, 1min, 72℃, 2min, 30サイクル, Gene Amp PCR System Model 9600(ノーキンエルマ社製)) で行い、ATGと翻訳終止コドンをカバーする構造遺伝子領域の約1300 bpをpUC18ベクター (宝酒造社製) のSac IとSal Iサイトにクローン化した。なお、PCR用プライマーにはSac IサイトとSal Iサイトがそれぞれデザインされている。クローン化されたpurA断片の約1300bpの5'側から約520bpと710bpの位置にそれぞれHpa IおよびSnaB Iサイトが1ヶ所あるのでプラスミドをHpa IおよびSnaB Iで消化し、約190bp断片を除去したものを得る目的でT4 DNAリガーゼで連結した。このライゲイション液でE.coli JM109のcompetent cellを形質転換し、アンピシリン $25\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。18クローンの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、この中からFsp Iでは切断せず、Sac IおよびSal I切断で約1100bpの断片が得られるプラスミドDNA(pUC18purA' #1)を選択した。本プラスミドDNAが有するpurAはHpa IおよびSnaB Iサイト間でdel eteが生じることになり、コードされる酵素は機能を持たなくなると予測される

(図2)。

【0057】

次に、pUC18purA' #1をSac I とSal I 消化し、purAを含む約1.1Kbの断片を調製した。この断片を温度感受性複製起点(tsoni)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997(図1)のSac I -Sal I サイトに挿入し、目的の形質転換体を得た。この形質転換体より調製したプラスミドpMAN997purA' #1でF-2-51株(purF⁻)を30°Cで形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン25μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニー化するようにアンピシリン25μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42°Cで生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42°Cで生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した後に、LB液体培地3ml/試験管に接種し、42°Cで3~4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釀($10^{-5} \sim 10^{-6}$ 程度)し、LB寒天プレートに塗布し、42°Cで一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から適当に100コロニーをピックアップしてそれぞれをLB寒天プレートとアンピシリン25μg/mlを含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。さらにアンピシリン感受性のクローンの中から最小培地+ヒポキサンチン 50mg/L添加培地に生育せず、最小培地+アデニン 50mg/L添加培地には生育するクローンを選択した。さらにはこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRによりpurA約1.1kb断片を増幅させ、野生型(約1.3kb)よりサイズが小さいこと、およびFsp Iで切断されないことを確認した。以上を満足するクローンをpurA欠失株とし、ここではFA-31株とした。

【0058】

3) Purine nucleoside phosphorylase遺伝子(deoD)欠失株の取得

遺伝子データバンク(E.coli Gene Bank)において「deoD」をキーワードにして検索される情報に基づいて作製された、CTCGTCGACGCCGGTCTGGAACTGTTGAC(配列番号5)とCTCGCATGCCGTGCTTACCAAAGCGAAC(配列番号6)の30merと31mer

の両端プライマーによるPCR法 (94°C, 30sec, 55°C, 1min, 72°C, 2min, 30サイクル, Gene Amp PCR System Model 9600(パーキンエルマー社製)) を行い、SD-ATGと翻訳終止コドンをカバーするdeoD構造遺伝子領域を含む約1350bpをpCRTMIIベクター (Invitrogen社製) にクローニングした。本ベクターはクローニングサイトの両近傍に制限酵素サイトとしてEcoRIサイトが存在する。またPCR用プライマーにはSal I サイトとSph I サイトがそれぞれデザインされている。クローニングされたdeoD断片の約1350bpの5'側から約680bpの位置にHpa I サイトが1ヶ所あるのでプラスミドをHpa I で消化し、消化されたプラスミドと10merのCla I リンカーとを混合してT4 DNAリガーゼ反応を行った。この結果、Hpa I サイトにCla I サイトが挿入された。このライゲイション液でE.coli HB101のcompetent cellを形質転換し、アンピシリン25 μg/mlを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。16クローンの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、この中からHpa I では切断せず、Cla I で切断されるプラスミドDNA(pCRTMIIdeoD' #16)を選択した。本プラスミドDNAが有するdeoDはHpa I サイトでフレームシフトが生じることになり、コードされる酵素は機能を持たなくなると予測される(図2)。

【0059】

次に、pCRTMIIdeoD' #16をEcoRI消化し、deoDを含む約1.35Kbの断片を調製した。この断片を温度感受性複製起点(tsoni)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997(図1)のEcoRIサイトに挿入し、目的の形質転換体を得た。この形質転換体より調製したプラスミドpMAN997deoD' #16でF-1-72株(purF⁻)およびFA-31株(purF⁻, purA⁻)を30°Cで形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン25 μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニー化するようにアンピシリン25 μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42°Cで生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42°Cで生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した後に、LB液体培地3ml/試験管に接種し、42°Cで3~4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釈(

$10^{-5} \sim 10^{-6}$ 程度)し、LB寒天プレートに塗布し、42°Cで一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から適当に100コロニーをピックアップしてそれをLB寒天プレートとアンピシリン25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。さらにアンピシリン感受性のクローンをLB+イノシン 1g/L添加培地に生育させ、これらの培養液を薄層クロマトグラムにより分析して、イノシンがヒポキサンチンに分解していないクローンを選択した。さらにはこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRによりdeoD約1.35kb断片を増幅させ、Cla Iで切断されるがHpa Iで切断されないことを確認した。以上を満足するクローンをdeoD欠失株とし、F-1-72株(purF⁻)およびFA-31株(purF⁻, purA⁻)由来のものをそれぞれFD-6株およびFAD-25株とした。

【0060】

4) Purine repressor遺伝子(purR)欠失株の取得

遺伝子データバンク (E.coli Gene Bank)において「purR」をキーワードにして検索される情報に基づいて作製された、CTCGTCGACGAAAGTAGAACGCGTCATCAG (配列番号7) とCTCGCATGCTAACGACGATAAGTCGG (配列番号8) の29merと28merの両端プライマーによるPCR法 (94°C, 30sec, 55°C, 1min, 72°C, 2min, 30サイクル, Gene Amp PCR System Model 9600(パーキンエルマー社製)) を行い、ATGと翻訳終止コドンをカバーするpurR構造遺伝子領域およびATGの5'上流域約800bpを含む約1.8kbを取得した。PCR用プライマーにはSal I サイトとSph I サイトがそれぞれデザインされており、このサイトを利用してpUC19ベクター (宝酒造社製) のSal I サイト、Sph I サイトにクローニングした。クローン化されたpurR断片の約1.8kbの5'側から約810bpの位置にPmaCI サイト (purR構造遺伝子領域でのN末端近傍) が1ヶ所あるのでプラスミドをPmaCIで消化した。消化されたプラスミドと8merのBglIIIリンカーを混合してT4 DNA リガーゼ反応を行った。この結果、PmaCIサイトにBglII Iサイトが挿入された。このライゲイション液でE.coli JM109のcompetent cellを形質転換し、アンピシリン25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。10クローンの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、この中からPma CIでは切断せず、BglIIIで切断されるプラスミドDNA(pUC19purR' #2)を選択した

。本プラスミドDNAが有するpurRはPmaCIサイトでフレームシフトが生じることになり、コードされる酵素は機能を持たなくなると予測される（図2）。

【0061】

次に、pUC19purR' #2をSac IとSph I消化し、purRを含む約1.8Kbの断片を調製した。この断片を温度感受性複製起点(tsoni)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997（図1）のSac IとSph Iサイトの間に挿入し、目的の形質転換体を得た。この形質転換体より調製したプラスミドpMAN997purR' #2でFD-6株（purF⁻, deoD⁻）およびFAD-25株（purF⁻, purA⁻, deoD⁻）を30℃で形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン25μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、30℃で一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニー化するようにアンピシリソ25μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42℃で生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42℃で生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローニを選択した。本クローニがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローニの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30℃で一晩培養した後に、LB液体培地3ml／試験管に接種し、42℃で3～4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釀(10^{-5} ～ 10^{-6} 程度)し、LB寒天プレートに塗布し、42℃で一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から適当に100コロニーをピックアップしてそれぞれをLB寒天プレートとアンピシリソ25μg/mlを含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリソ感受性のクローニを選んだ。さらにアンピシリソ感受性のクローニの中から10クローニを適当に選び、これらの染色体DNAからPCRによりpurR約1.8kb断片を増幅させ、BgIIIで切断されるがPmaCIで切断されないクローニを選択した。これらのクローニをpurR欠失株とし、FD-6株（purF⁻, deoD⁻）およびFAD-25株（purF⁻, purA⁻, deoD⁻）由来のものをそれぞれFDR-18株およびFADR-8株とした。なお、purRが破壊された株では、PRPP amidotransferase活性がpurR非破壊株に比べて増大していることは、deoDおよびpurRが欠失した株や、purA、deoDおよびpurRが欠失した株を用いて確認された。

【0062】

5) 脱感作型PRPP amidotransferase遺伝子(purF)の作製

1)でpCRTMIIベクター(Invitrogen社製)にクローン化した約1530bpのpurFを搭載したプラスミドよりPst IとHindIII消化によりpurF断片を切り出し、変異導入用プラスミドpKF18(宝酒造社製)のマルチクローニングサイトのPst IとHind IIIサイトに挿入し直し、目的のクローンを得た(pKFpurF)。G.Zhouら(J.Biol.Chem., 269, 6784(1994))により、PRPP amidotransferase(PurF)の326番目のLys(K)をGln(Q)に、さらに410番目のPro(P)をTrp(W)に変異したものがそれぞれGMPおよびAMPのフィードバック阻害に対して脱感作されていることが示されている。そこで、PRPP amidotransferase(PurF)の326番目のLys(K)をGln(Q)に、410番目のPro(P)をTrp(W)に変異できるような遺伝子置換を行うために以下の合成DNAプライマーを作製し、Site-directed Mutagenesis System Mutan-Super Express K m(宝酒造社製)のプロトコールに従って、pKFpurFに部位特異的変異を導入した。

K326Q変異用プライマー；5'-GGGCTTCGTT CAG AACCGCTATGTTGG-3' (配列番号9)

P410W変異用プライマー；5'-TATGGTATTGATATG TGG AGCGCCACGGAAC-3' (配列番号10)

【0063】

変異導入操作後、得られた形質転換体のそれぞれ6クローンずつをランダムにピックアップし、プラスミドを調製し、変異導入個所周辺の塩基配列を解析した結果、目的のものが得られたことが確認された。さらにpKFpurFKQよりP410W(410 Pro→Trp)の変異を同じ方法で導入し、二つの変異を同時に持つ変異型プラスミドpKFpurFKQPWも作製した。また本pKFpurFKQ、pKFpurFPW、およびpKFpurFKQPWはpKF18由来のlacp/o(lactose operonのpromoter)の下流に変異型のpurFが挿入されており、本promoterの支配下にpurFが発現する。

【0064】

またこれらのプラスミドでE.coli JM109を形質転換した組換え体をLB液体培地で8時間培養した後に菌体を集め、粗酵素抽出液を調製した。これらのPRPP amidotransferase活性およびAMPやGMPによる阻害度の測定をL.J.Messengerら(J.Biol.

.Chem., 254, 3382(1979))の方法に従って行った。その結果を表1に示した。

【0065】

【表1】

PRPP amidotransferase活性およびAMPやGMPによる阻害

宿主	プラスミド	PRPP amidotransferase活性(μmole/min/mg)		
		None	10mM AMP	10mM GMP
JM109		0.001		
JM109	pKFpurF	0.68	0.48	0.10
JM109	pKFpurFKQ	0.34	0.32	0.33
JM109	pKFpurFKQPW	0.18	0.16	0.17

【0066】

6)変異型purFプラスミド導入によるプリンヌクレオシド生産評価

4)で作製したFDR-18株(purF⁻, deoD⁻, purR⁻)およびFADR-8株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻)にpKFpurFKQおよびpKFpurFKQPWを導入した形質転換体を作製し、これらの株のプリンヌクレオシド生産能を評価した。

以下にプリンヌクレオシド生産用の基本培地および培養方法ならびに分析方法を示す。

【0067】

1. 基本培地：MS培地

最終濃度

Glucose	40g/L (別殺菌)
(NH ₄) ₂ SO ₄	16g/L
KH ₂ PO ₄	1g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01g/L

MnSO₄·4H₂O 0.01g/L

Yeast extract 2g/L

CaCO₃ 30g/L (別殺菌)

【0068】

2. 培養方法 (坂口フラスコ)

refresh; 37°C、LB+必要に応じて薬剤添加寒天培地で、一晩培養

seed培養; 37°C、LB+必要に応じて薬剤添加液体培地で、一晩培養

main培養; seed液体培地から2% seed

MS培地 (必要に応じてアデニン、薬剤添加)

37°C、20ml/500ml容坂口フラスコ

【0069】

3. 分析方法

培養液500μlを経時的にサンプリングし、15,000rpm、5min間遠心し、その上清液をH₂Oにて4倍希釈後、HPLC分析する。

分析条件: column : Asahipak GS-220 (7.6mmID×500mmL)

Buffer : 0.2M NaH₂PO₄ (pH3.98) リン酸にてpH調整

Temperature : 55°C

Flow Rate : 1.5ml/min

Detect : UV254nm

RETENTION TIME (min)

Inosine 16.40

Hypoxanthine 19.27

Guanosine 20.94

Guanine 23.55

Adenine 24.92

Adenosine 26.75

【0070】

プリンヌクレオシド生産培養結果を表2に示す。purA⁻(アデニン要求性)の菌株についてはMS培地にアデニン 5mg/Lが添加されている。W3110(野生株)に比

べ、わずかなイノシンの生産が認められた。

【0071】

【表2】

プリンヌクレオシド生産評価

宿主	プラスミド	プリンヌクレオシド蓄積	
		イノシン(mg/L)	グアノシン(mg/L)
W3110		trace	0
FDR-18	pKFpurFKQ	115	0
FDR 18	pKFpurFKQPW	110	0
FADR 8	pKFpurFKQ	66	0
FADR-8	pKFpurFKQPW	62	0

【0072】

【実施例2】

1) Adenosine deaminase遺伝子(add)欠失株の取得

遺伝子データバンク (E.coli Gene Bank)において「add」をキーワードにして検索される情報に基づいて作製された、CTCGTCGACGGCTGGATGCCCTTACGCATC (配列番号11) とCTCGCATGCAGTCAGCACGGTATATCGTG (配列番号12) の29merと29merの両端プライマーによるPCR法 (94°C, 30sec, 55°C, 1min, 72°C, 2min, 30サイクル, Gene Amp PCR System Model 9600(パーキンエルマー社製)) を行い、ATGと翻訳終止コドンをカバーするadd構造遺伝子領域およびATGの5'上流域約420bpおよび翻訳終止コドンの下流域約370bpを含む約1.8kbを取得した。PCR用プライマーにはSal I サイトとSph I サイトがそれぞれデザインされており、このサイトを利用してpUC19ベクター (宝酒造社製) のSal I、Sph I サイトにクローニングした。クローン化されたadd断片の約1.8kbの5'側から約880bpの位置にStu I サイトが1ヶ所あるのでプラスミドをStu I で消化した。消化されたプラスミドと8merのBgIIIリンクーと

を混合し、T4 DNA リガーゼ反応を行った。この結果、StuIサイトにBgIIIサイトが挿入された。このライゲイション液でE.coli JM109のcompetent cellを形質転換し、アンピシリン $25\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。10クローンの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、この中からStuIでは切断されず、BgIIIで切断されるプラスミドDNA(pUC19add' #1)を選択した。本プラスミドDNAが有するaddはStuIサイトでフレームシフトが生じることになり、コードされる酵素は機能を持たなくなると予測される(図2)。

【0073】

次に、pUC19add' #1をSac IとSph I消化し、addを含む約1.8Kbの断片を調製した。この断片を温度感受性複製起点(tsori)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997(図1)のSac IとSph Iサイトの間に挿入し、目的の形質転換体を得た。この形質転換体より調製したプラスミドpMAN997add' #1でFDR-18株(purF⁻, deoD⁻, purR⁻)およびFADR-8株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻)を30°Cで形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン $25\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニー化するようアンピシリン $25\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天プレートに塗布し、42°Cで生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42°Cで生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した後に、LB液体培地3ml/試験管に接種し、42°Cで3~4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釀($10^{-5}\sim10^{-6}$ 程度)し、LB寒天プレートに塗布し、42°Cで一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から適当に10コロニーをピックアップしてそれぞれをLB寒天プレートとアンピシリン $25\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。さらにアンピシリン感受性のクローンをLB+アデノシン1.5g/L添加培地に生育させ、これらの培養液を薄層クロマトグラムにより分析して、アデノシンがイノシンに転換していないクローンを選択した。さらにこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRによりadd約1.8kb断片を増幅させ、Bg

IIIで切断されるがStu Iで切断されないことを確認した。これらのクローンをadd欠失株とし、FDR-18株 ($\text{purF}^-, \text{deoD}^-, \text{purR}^-$) およびFADR-8株 ($\text{purF}^-, \text{purA}^-, \text{deoD}^-, \text{purR}^-$) 由来のものをそれぞれFDRadd-18-1株およびFADRadd-8-3株とした。

【0074】

2) 脱感作型purFプラスミド導入によるプリンヌクレオシド生産評価

1) で作製したFDRadd-18-1株 ($\text{purF}^-, \text{deoD}^-, \text{purR}^-, \text{add}^-$) およびFADRadd-8-3株 ($\text{purF}^-, \text{purA}^-, \text{deoD}^-, \text{purR}^-, \text{add}^-$) にpKFpurFKQおよびpKFpurFKQPWを導入した形質転換体を作製し、これらの株のプリンヌクレオシド生産能を評価した。なお、FADRadd-8-3株については野生型purFプラスミド(pKFpurF)による形質転換体も作製し、脱感作型pKFpurFKQによる形質転換体およびpKFpurFKQPWによる形質転換体と比較評価した。プリンヌクレオシド生産用の基本培地および培養方法ならびに分析方法は実施例1と同じである。

【0075】

プリンヌクレオシド生産培養結果を表3に示す。 purA^- (アデニン要求性)の菌株についてはMS培地にアデニン5mg/Lが添加されている。W3110(野生株)に比べ、優位なイノシンの生産が認められた。また、野生型purFに比べ、脱感作型purF KQおよびpurFKQPWの効果が認められた。

【0076】

【表3】

プリンヌクレオシド生産評価

宿主	プラスミド	プリンヌクレオシド蓄積	
		イノシン(mg/L)	グアノシン(mg/L)
W3110	-	trace	0
FDRadd-18-1	pKFpurFKQ	220	0
FDRadd-18-1	pKFpurFKQPW	215	0
FADRadd-8-3	pKFpurFKQ	1080	0
FADRadd-8-3	pKFpurFKQPW	1030	0
FADRadd-8-3	pKFpurF	805	0

【0077】

【実施例3】

1) 脱感作型purF相同組換えプラスミドの作製

実施例1の1)で作製したpurF⁻株を利用して脱感作型purFを染色体置換するために、先に取得したpurF（約1.6kb）よりもさらに3'側に約0.5kb長いpurFを取得した。purFの取得は、実施例1に記載した遺伝子データバンク（E.coli Gene Bank）の情報に基づき、CTCCTGCAGAACGAGGAAAAAGACGTATG（配列番号1）とCTCAA GCTTGTCTGATTTATCACATCATC（配列番号13）の29merと29merの両端プライマーによるPCR法（94°C, 30sec, 55°C, 1min, 72°C, 2min, 30サイクル, Gene Amp PCR System Model 19600(ノーキンエルマ-社製)）で行い、SD-ATGと翻訳終止コドンをカバーする構造遺伝子領域を含む約2.1kbをpCRTMIIベクター（Invitrogen社製）にクローニングした。このクローニングの保持するプラスミドをpCRTMIIpurF^Lとする。pCRTMIIpurF^Lはクローニングサイトの両近傍に制限酵素サイトとしてEcoRIサイトが存在する。またPCR用プライマーにはPstIサイトとHindIIIサイトがそれぞれデザインされている。

【0078】

次にpCRTMIIpurF^LをSnaB IとHindIII消化し、purFのコーディング領域のC末端より下流の約0.65kbの断片を得た。この断片を実施例1の5)で得たpKFpurFKQおよびpKFpurFKQPWのSnaB IとHindIIIサイト間に挿入し、pKFpurF^LKQおよびpKFpurF^LKQPWを作製した。

【0079】

次に、pKFpurF^LKQおよびpKFpurF^LKQPWをEcoR IとHindIII消化し、purF^LKQおよびpurF^LKQPWを含む約2.1Kbの断片を調製した。この断片を温度感受性複製起点(t_{sor i})を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997(図1)のEcoR IとHindIIIサイトの間に挿入し、それぞれ目的の形質転換体を得た。これらの形質転換体よりそれぞれプラスミドpMAN997purF^LKQおよびpMAN997purF^LKQPWを調製した。

【0080】

2) 脱感作型purF染色体組込み株の作製

プラスミドpMAN997purF^LKQおよびpMAN997purF^LKQPWでそれぞれFDRadd-18-1株(purF⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻)およびFADRAadd-8-3株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻)を30°Cで形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン25μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニー化するようにアンピシリン25μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42°Cで生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42°Cで生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した後に、LB液体培地3ml/試験管に接種し、42°Cで3~4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釀(10^{-5} ~ 10^{-6} 程度)し、LB寒天プレートに塗布し、42°Cで一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から適当に100コロニーをピックアップしてそれをLB寒天プレートとアンピシリン25μg/mlを含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。さらにアンピシリン感受性のクローンの中から、FDRadd-18-1株(purF⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻)の場合

には最小培地に生育し、FADRadd-8-3株(purF⁻,purA⁻,deoD⁻,purR⁻,add⁻)の場合には最小培地+L-ヒスチジン 100mg/L+アデニン 50mg/L添加培地に生育するクローンを選択した。

【0081】

さらにはこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRによりpurF約1.5kb断片を増幅させ、相同組換え置換による変異導入個所周辺の塩基配列を解析した結果、K326Q(326Lys→Gln)の変異、およびK326Q(326Lys→Gln)+P410W(410Pro→Trp)の変異をそれぞれが持つことが確認された。

【0082】

FDRadd-18-1株 (purF⁻,deoD⁻,purR⁻,add⁻) 由来のものをFDRadd-18-1:::KQ株 (purFKQ,deoD⁻,purR⁻,add⁻) およびFDRadd-18-1:::KQPW株 (purFKQPW,deoD⁻,purR⁻,add⁻) とし、FADRadd-8-3株(purF⁻,purA⁻,deoD⁻,purR⁻,add⁻)由来のものをFADR add-8-3:::KQ株(purFKQ,purA⁻,deoD⁻,purR⁻,add⁻) およびFADRadd-8-3:::KQPW株 (purFKQPW,purA⁻,deoD⁻,purR⁻,add⁻)と命名した。

【0083】

3) 脱感作型purF染色体組込み株のプリンヌクレオシド生産評価

2)で作製したFDRadd-18-1:::KQ株 (purFKQ,deoD⁻,purR⁻,add⁻) およびFDRadd-18-1:::KQPW株 (purFKQPW,deoD⁻,purR⁻,add⁻) ,FADRadd-8-3:::KQ株 (purFKQ,purA⁻,deoD⁻,purR⁻,add⁻) およびFADRadd-8-3:::KQPW株 (purFKQPW,purA⁻,deoD⁻,purR⁻,add⁻) のプリンヌクレオシド生産能を評価した。プリンヌクレオシド生産用の基本培地および培養方法ならびに分析方法は実施例1と同じである。

【0084】

プリンヌクレオシド生産培養結果を表4に示す。purA⁻(アデニン要求性)の菌株についてはMS培地にアデニン 5mg/Lが添加されている。W3110(野生株)に比べ、優位なイノシン生産が認められた。

【0085】

【表4】

プリンヌクレオシド生産評価

菌株	プリンヌクレオシド蓄積	
	イノシン(mg/L)	グアノシン(mg/L)
W3110	trace	0
FDRadd-18-1::KQ	110	0
FDRadd-18-1::KQPW	105	0
FADRadd-8-3::KQ	635	0
FADRadd-8-3::KQPW	620	0

【0086】

【実施例4】

1) Inosine-guanosine kinase遺伝子(gsk)欠失株の取得

gskの取得は遺伝子データバンク (GenBank Accession No.D00798) の情報に基づき、CTCGAGCTCATGAAATTCCCGGとCTCGGATCCGGTACCATGCTGの23merと21merの両端プライマーによるPCR法 (94°C, 30sec, 55°C, 1min, 72°C, 2min, 30サイクル, Gene Amp PCR System Model19600(ペーキンエルマ-社製)) で行い、ATGと翻訳終止コドンをカバーする構造遺伝子領域を含む約1.5kbをpUC18ベクター（宝酒造社製）のSac I サイトとBamH I サイトにクローン化した。PCR用プライマーにはSac I サイトとBamH I サイトがそれぞれデザインされている。

【0087】

クローン化されたgsk断片の約1.5kbの5'側から約830bpの位置にBglIIサイトが1ヶ所あるのでプラスミドをBglIIで消化し、そこにカナマイシン耐性 (K_m^r) 遺伝子GenBlock (BamH I 消化物、ファルマシアバイオテク社製) を挿入する目的でT4 DNAリガーゼ反応を行った。このライゲイション液でE.coli JM109のcompetent cell

を形質転換し、カナマイシン $50\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。4クローンの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、この中からBgII Iでは切断されず、EcoRIとSalI消化で約2.8kbの断片が切り出されるプラスミドDNA(pUCgsk' #2)を選択した。本プラスミドDNAが有するgskはBgIIIサイトで異種遺伝子が挿入されることになり、コードされる酵素は機能を持たなくなると予測される(図2)。

【0088】

次に、pUCgsk' #2をSacI、SphIおよびDraI消化し、gskとKm^r遺伝子を含む約2.8Kbの断片を調製した。DraI消化の目的は、SacI-SphI断片の取得を容易にすることである。この断片を温度感受性複製起点(tsori)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997(図1)のSacIとSphIサイトに挿入し、目的の形質転換体を得た。この形質転換体より調製したプラスミドpMAN997gsk' #2でFDR-18株(purF⁻, deoD⁻, purR⁻)およびFADRaadd-8-3株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻)を30°Cで形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン $25\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニー化するようにアンピシリン $25\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天プレートに塗布し、42°Cで生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42°Cで生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した後に、LB液体培地3ml/試験管に接種し、42°Cで3~4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釀($10^{-5}\sim10^{-6}$ 程度)し、LB寒天プレートに塗布し、42°Cで一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から適当に100コロニーをピックアップしてそれぞれをLB寒天プレート、アンピシリン $25\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天プレートおよびカナマイシン $20\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天プレートに生育させ、アンピシリン $25\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天プレートには生育しないがカナマイシン $20\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天プレートには生育するクローンを選んだ。さらにこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRによりgsk遺伝子を増幅させ、本来の約1.5kb断片ではなくKm^r遺伝子を含む約2.8kb断片が増幅されている

ことを確認した。またこれらのinosine-guanosine kinase活性が検出されないことを確認した。これらのクローンをgsk欠失株とし、FDR-18株 ($purF^-$, $deoD^-$, $purR^-$) およびFADRaadd-8-3株 ($purF^-$, $purA^-$, $deoD^-$, $purR^-$, add^-) 由来のものをそれぞれFDRG-18-13株およびFADRaaddG-8-3株とした。

【0089】

2) 脱感作型purFプラスミド導入によるプリンヌクレオシド生産評価

1) で作製したFDRG-18-13株 ($purF^-$, $deoD^-$, $purR^-$, gsk^-) およびFADRaaddG-8-3株 ($purF^-$, $purA^-$, $deoD^-$, $purR^-$, add^- , gsk^-) にpKFpurFKQおよびpKFpurFKQPWを導入し、プリンヌクレオシド生産能を評価するにあたり、プラスミドpKFpurFKQおよびpKFpurFKQPWは薬剤選択マーカー遺伝子が Km^r 遺伝子であり、宿主FDRG-18-13株およびFADRaaddG-8-3株もまたカナマイシン耐性となっているので、形質転換体を得るのが困難である。そこでプラスミドpKFpurFKQおよびpKFpurFKQPWの薬剤選択マーカー遺伝子の交換をアンピシリン耐性遺伝子を持つpUC18ベクター（宝酒造社製）を用いて行った。pKF18とpUC18とはlac promoterとマルチクローニングサイトの位置関係が全く同じなので、pKFpurFKQおよびpKFpurFKQPWからPst I と HindII でpurFKQおよびpurFKQPW断片を切り出し、これらをpUC18のPst I と HindIII サイトの間に挿入し、pUCpurFKQおよびpUCpurFKQPWを作製した。これらで宿主FDRG-18-13株およびFADRaaddG-8-3株を形質転換し、組換え体のプリンヌクレオシド生産能を評価した。プリンヌクレオシド生産用の基本培地および培養方法ならびに分析方法は実施例1と同じである。

【0090】

プリンヌクレオシド生産培養結果を表5に示す。 $purA^-$ （アデニン要求性）の菌株についてはMS培地にアデニン 5mg/Lが添加されている。この結果よりgsk欠失を付与した場合にはイノシン蓄積と共にグアノシンも蓄積することが認められた。

【0091】

【表5】

プリンヌクレオシド生産評価

宿主	プラスミド	プリンヌクレオシド蓄積	
		イノシン(mg/L)	グアノシン(mg/L)
W3110	-	trace	0
FDRG-18-13	pUCpurFKQ	105	139
FDRG-18-13	pUCpurFKQPW	108	93
FADRaddG-8-3	pUCpurFKQ	126	52
FADRaddG-8-3	pUCpurFKQPW	222	49

【0092】

3) 脱感作型purF染色体組込み株の作製とプリンヌクレオシド生産評価

プラスミドpMAN997purF^LKQおよびpMAN997purF^LKQPWでそれぞれFDRG-18-3株(purF⁻, deoD⁻, purR⁻, gsk⁻)およびFADRaddG-8-3株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, gsk⁻)を30℃で形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン25μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、30℃で一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニー化するようにアンピシリン25μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42℃で生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42℃で生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30℃で一晩培養した後に、LB液体培地3ml/試験管に接種し、42℃で3~4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釀(10⁻⁵~10⁻⁶程度)し、LB寒天プレートに塗布し、42℃で一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から適当に100コロニーをピックアップしてそれをLB寒天

プレートとアンピシリン $25\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。さらにアンピシリン感受性のクローンの中から、FDRG-18-13株 ($\text{purF}^-, \text{deoD}^-, \text{purR}^-, \text{gsk}^-$) の場合には最小培地に生育し、FADRaaddG-8-3株 ($\text{purF}^-, \text{purA}^-, \text{deoD}^-, \text{purR}^-, \text{add}^-, \text{gsk}^-$) の場合には最小培地+L-ヒスチジン 100mg/L+アデニン 50mg/L添加培地に生育するクローンを選択した。

【0093】

さらにはこれらの目的クローンの染色体DNAを調製し、PCRにより purF 約1.5kb 断片を増幅させ、相同組換え置換による変異導入個所周辺の塩基配列を解析した結果、K326Q(326Lys→Gln)の変異、およびK326Q(326Lys→Gln)+P410W(410Pro→Trp)の変異をそれぞれが持つことが確認された。

【0094】

FDRG-18-13株 ($\text{purF}^-, \text{deoD}^-, \text{purR}^-, \text{gsk}^-$) 由来のものをFDRG-18-13::KQ株 ($\text{purFKQ}, \text{deoD}^-, \text{purR}^-, \text{gsk}^-$) およびFDRG-18-13::KQPW株 ($\text{purFKQPW}, \text{deoD}^-, \text{purR}^-, \text{gsk}^-$) とし、FADRaaddG-8-3株 ($\text{purF}^-, \text{purA}^-, \text{deoD}^-, \text{purR}^-, \text{add}^-, \text{gsk}^-$) 由来のものをFADRaaddG-8-3::KQ株 ($\text{purFKQ}, \text{purA}^-, \text{deoD}^-, \text{purR}^-, \text{add}^-, \text{gsk}^-$) およびFADRaaddG-8-3::KQPW株 ($\text{purFKQPW}, \text{purA}^-, \text{deoD}^-, \text{purR}^-, \text{add}^-, \text{gsk}^-$) と命名した。

【0095】

FADRaaddG-8-3::KQ株 ($\text{purFKQ}, \text{purA}^-, \text{deoD}^-, \text{purR}^-, \text{add}^-, \text{gsk}^-$) には、プライベート・ナンバーAJ13334が付与された。同株は、1997年6月24日付けで通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に、ブタペスト条約に基づいて国際寄託され、受託番号として、FERM BP-5993が付与された。

【0096】

これらの4種の脱感作型 purF 染色体組込み株のプリンヌクレオシド生産能を評価した。プリンヌクレオシド生産用の基本培地および培養方法ならびに分析方法は実施例1と同じである。

【0097】

プリンヌクレオシド生産培養結果を表6に示す。 purA^- (アデニン要求性)の菌株についてはMS培地にアデニン 5mg/Lが添加されている。この結果より gsk 欠失

を付与した場合にはイノシン蓄積と共にグアノシンも蓄積することが認められた

【0098】

【表6】

プリンヌクレオシド生産評価

菌株	プリンヌクレオシド蓄積	
	イノシン(mg/L)	グアノシン(mg/L)
W3110	trace	0
FDRG-18-13::KQ	150	140
FDRG-18-13::KQPW	145	125
FADRaddG-8-3::KQ	550	135
FADRaddG-8-3::KQPW	530	130

【0099】

【配列表】

【0100】

配列番号：1

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCCTGCAGA ACGAGGAAAA AGACGTATG

29

【0101】

配列番号：2

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCAAGCTT CATCCTTCGT TATGCATTTC G

31

【0102】

配列番号：3

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCGAGCTCA TGGGTAACAA CGTCGTCGTA C

31

【0103】

配列番号：4

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCGTCGACT TACGCGTCGA ACGGGTCGCG C

31

【0104】

配列番号：5

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCGTCGACG CGGGTCTGGA ACTGTTCGAC

30

【0105】

配列番号：6

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCGCATGCC CGTGCTTAC CAAAGCGAAT C

31

【0106】

配列番号：7

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCGTCGACG AAAGTAGAAG CGTCATCAG

29

【0107】

配列番号：8

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCGCATGCT TAACGACGAT AGTCGCGG

28

【0108】

配列番号：9

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGGCTTCGTT CAGAACCGCT ATGTTGG

27

【0109】

配列番号：10

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TATGGTATTG ATATGTGGAG CGCCACGGAA C

31

【0110】

配列番号：11

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCGTCGACG GCTGGATGCC TTACGCATC

29

【0111】

配列番号：12

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCGCATGCA GTCAGCACGG TATATCGTG

29

【0112】

配列番号：13

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCAAGCTTG TCTGATTAT CACATCATC

29

【0113】

配列番号：14

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCGAGCTCA TGAAATTCC CGG

23

【0114】

配列番号：15

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCGGATCCG GTACCATGCT G

21

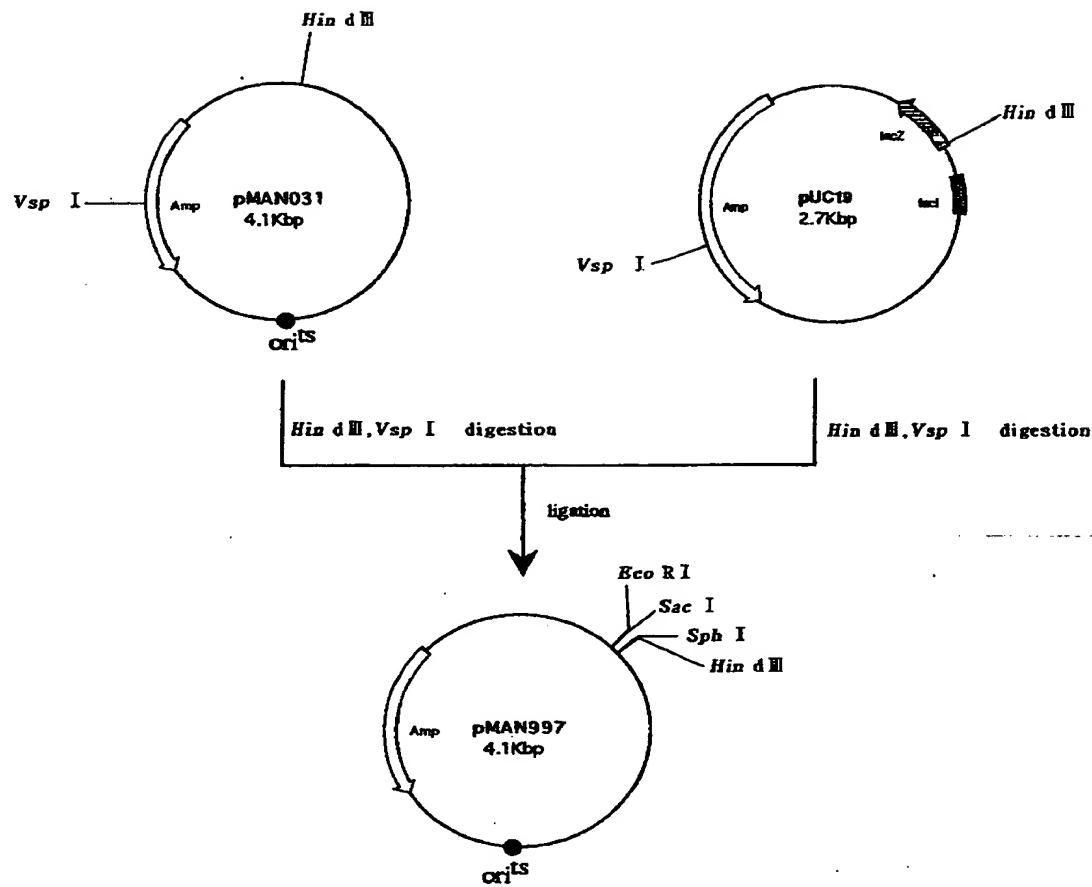
【図面の簡単な説明】

【図1】pMAN997の構築図。

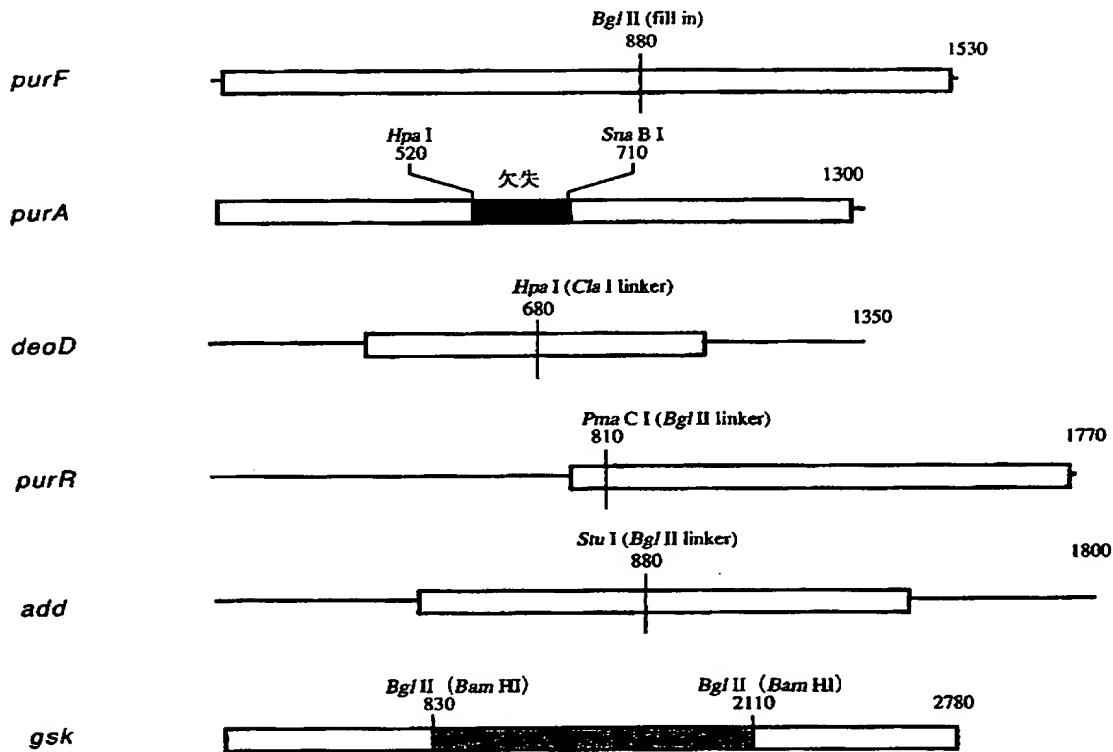
【図2】相同組換え用遺伝子の構造。

【書類名】 図面

【図1】



【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 プリンヌクレオシドを発酵法により生産するに当たり、好適な微生物を創製する。

【解決手段】 エシェリヒア・コリでのプリンヌクレオシド生産に関し、プリンヌクレチド生合成系で制御を受ける酵素を脱抑制および脱感作し、さらには分解系や転換系をブロックすることによりプリンヌクレオシド生産菌株を育種する。

エシェリヒア・コリのpurFにコードされるPRPP amidotransferaseの1ないし2アミノ酸置換により実質的にフィードバック阻害が解除された酵素をコードする遺伝子、purRにコードされるプリンヌクレチド生合成系のリプレッサーが不活性化されたタンパク質をコードする遺伝子、ならびにdeoDにコードされるpurine nucleoside phosphorylaseが不活性化された酵素をコードする遺伝子等を有する微生物を育種し、当該微生物を培養することによりプリンヌクレオシドを製造する。

【選択図】 なし。

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】 申請人
【識別番号】 000000066
【住所又は居所】 東京都中央区京橋1丁目15番1号
【氏名又は名称】 味の素株式会社

出願人履歴情報

識別番号 [00000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号
氏 名 味の素株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)